Immunhistochemische Untersuchungen über T- und B-Lymphozyten in Frühkarzinomen und fortgeschrittenen Karzinomen des Magens

von
Soussan Salehnia
und
Heinz-Jürgen Bach
1981

Diss. Düsseldorf

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. W. Hort

Immunhistochemische Untersuchungen über T- und B-Lymphozyten in Frühkarzinomen und fortgeschrittenen Karzinomen des Magens

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Soussan Salehnia
und
Heinz-Jürgen Bach
1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. G. Arnold

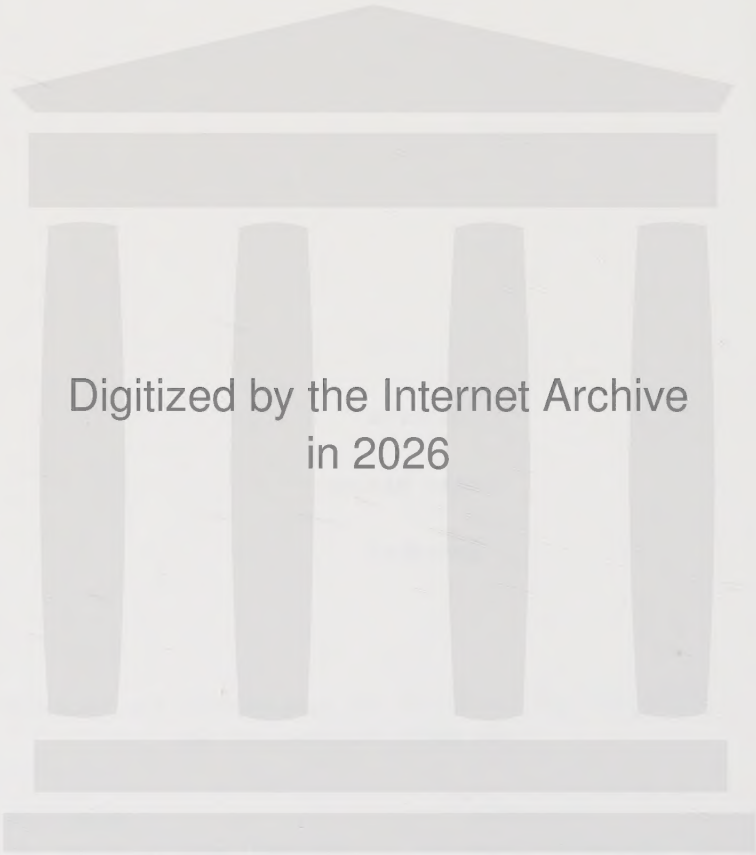
Referent
gez.: Prof. Dr. F. Borchard

Korreferent
gez.: Prof. Dr. W.P. Fritsch

Unseren

lieben Eltern

gewidmet


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0046

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite 1 - 2
Material und Methodik	Seite 3 - 11
Ergebnisse	Seite 12 - 17
Diskussion	Seite 18 - 24
Zusammenfassung	Seite 25
Abbildungen	Seite 26 - 31
Literaturverzeichnis	Seite 32 - 46

Danksagung
Lebensläufe

Immunhistochemische Untersuchungen über Lymphozytenpopulationen in Frühkarzinomen und fortgeschrittenen Karzinomen des Magens

I. Einleitung

Das Konzept der Tumor-Surveillance ist seit langem bekannt (Steiner, 1948). In immer zahlreicher werdenden Veröffentlichungen wird das Problem dargestellt (vgl. Warnatz, 1975 und 1978; Keller, 1977; Roitt, 1977; Sell, 1977; Castro, 1978; Grundmann, 1974; Kruse et al, 1979). Serologische Befunde stehen dabei im Vordergrund (vgl. Nath et al, 1976; Bolhuis et Nooyen, 1977; Gattringer et Wick, 1977; Weber et al, 1977; Walters et al, 1979). Unter diesem Gesichtspunkt schien es von Interesse, Lymphozyten im Tumorgewebe selbst darzustellen. Zur Differenzierung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen im Gewebe sind unterschiedliche Methoden beschrieben worden:

1. Die histochemische Markierung der T-Lymphozyten mithilfe der sauren Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase (ANAE) (Mueller, J. et al, 1975; Barr, R.D. et Allardyce, M., 1978; Knowles, D.M. et Holck, S., 1978; Seymour, G.J. et al, 1978; Catovsky, D. et Costello, C., 1980). Nach Pinkus et al, 1980 stellt diese Methode keine konstant zuverlässige Alternative zur immunologischen Methode dar. Weitere histochemische Marker wurden untersucht (Borgers, M. et al, 1977; Sullivan, S.L., 1977; Seymour, G.J., 1978; Catovsky, D. et Costello, C., 1980).
2. Differenzierung der B- und T-Lymphozyten mittels Rosettenbildung mit Schaferythrozyten (Bianco et al, 1970; Dukor et al, 1970; Lay et al, 1971; Dickler und Kunkel, 1972; Jondal et al, 1972; Wybran et al, 1972; Yoshida et Anderson, 1972; Bobrove et al, 1974; Mercier, P., 1974; Moretta et al, 1975; Bolhuis et Nooyen, 1977; Gattringer et Wick, 1977).

UNIV. LEIDEN MED.

3. Semiquantitative Differenzierung der Lymphozytenpopulationen mittels mitogener Substanzen (Greaves et al, 1972; Manousos et al, 1973; Sell, 1977).
4. Darstellung der Lymphozytenpopulationen mithilfe der Immunofluoreszenz-Methode (Coons, A.H., 1941, 1950, 1956; Beutner et al, 1968; Biberfeld et al, 1974; Brutel de la R. et al, 1976; Kunkel, H.G., 1976), deren Nachteile Nakane et Pierce, 1967 herausstellten.
5. Aufgrund der größeren Empfindlichkeit der PAP-Methode (Peroxydase-anti-Peroxydase) (vgl. Sternberger, 1970) gegenüber der Immunofluoreszenz, der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Stabilität der Färbeprodukte wurde in der nachfolgenden Untersuchung die PAP-Methode verwandt (vgl. Graham, R. u. Karnovsky, M., 1965, 1966; Nakane, P., Pierce, G., 1967; Sternberger, L.A. et al, 1967, 1969, 1970, 1976; Leduc, E. et al, 1969; Glöckner, R. et al, 1972; Storch, H., 1975; Burns, J., 1975; Taylor, C.R. et al, 1974 - 1978; Sims, J. et al, 1976; Mesa-Tejada, R. et al, 1977; Hoffmann-Fezer, G. et al, 1974 - 1979; Wagener, C. et al, 1978).

An 6 Frühkarzinomen und 7 fortgeschrittenen Karzinomen des Magens wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung von B- und T-Lymphozyten mittels der PAP-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend semiquantitativ bzw. quantitativ ausgewertet.

II. Material und Methodik

1. Gewebe:

Aus dem histologischen Einsendungsgut des Pathologischen Instituts der Universität Düsseldorf wurden insgesamt 6 Frühkarzinome und 10 infiltrierende Karzinome des Magens untersucht (Tab. 1). Als Kontrollgewebe zum Nachweis der Darstellbarkeit der T- und B-Lymphozytenpopulationen verwendeten wir Tonsillen von Kindern und in einem Fall Milzgewebe. Dieses Material unterzogen wir den gleichen Behandlungsschritten wie das zu untersuchende Magengewebe.

2. Antiseren:

Kaninchen-Immunglobuline gegen menschliche T-Lymphozyten bezogen wir aus dem Institut Mérieux, Lyon sowie dem Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München. Kaninchen-Immunglobuline gegen menschliche B-Lymphozyten, jeweils als Anti-IgG- und Anti-IgM-Serum, Schweine-anti-Serum gegen Kaninchen-Immunglobuline, Peroxydase-anti-Peroxydase-Komplex (PAP-Komplex) sowie Schweine-Normalserum erhielten wir von der Fa. Nordic, Niederlande, und Dako-Immunglobuline der Fa. Boehringer Ingelheim, München; letztere brachten in unseren Händen bessere Ergebnisse (vgl. Taylor et Mason, 1974).

3. Gewebspräparation:

Unmittelbar postoperativ (bis ca. 30 Min.) wurden aus dem makroskopisch verdächtigen Tumorbereich des Magenresektats je nach Tumorgröße sowohl zentral als auch randständig in der Regel bis zu 2 cm lange und 5 mm breite Gewebsstreifen herausgeschnitten, die sofort in

	ALTER (J.)	M/W	LOK.	GRÖSSE Ø cm	ENDOSK. TYP	M/SM	LAURÉN KLASS.
1.	50	w	A/C	4,0	IIc/III	M	diffus
2.	51	m	C	2,5	IIc/III	M	diffus
3.	73	m	A/C	2,0	IIc/III	M	diffus
4.	69	w	A	7,0	IIc/III	SM	gemischt
5.	58	w	A/C	4,5	IIc	SM	gemischt
6.	73	m	A	3,0	IIc	M	gemischt

FRÜHKARZINOME

Alter und Geschlecht der Tumorträger, sowie makroskopische und mikroskopische Besonderheiten der untersuchten Frühkarzinome.

Tab. 1

	ALTER (J.)	M/W	LOK.	GRÖßE Ø cm	MAKRO. ASPEKT	LAURÉN KLASS.
1.	50	m	C	5,0	ulzer.	nicht klass.
2.	43	m	A	16,0	pol./ul.	gemischt
3.	60	w	A/C	3,5	ulzer.	diffus
4.	50	w	A/C	13,0	ulzer.	gemischt
5.	29	w	A	6,0	ulzer.	diffus
6.	65	m	A/C	3,5	ulzer.	gemischt
7.	75	m	C	10,0	polyp.	nicht klass.
8.	47	w	C	3,5	ulzer.	diffus

FORTGESCHRITTENE KARZINOME

Alter und Geschlecht der Tumorträger, sowie makroskopische und mikroskopische Besonderheiten der untersuchten fortgeschrittenen Karzinome.

Tab. 1

flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden. Von diesen Gewebsblöcken wurden 5 - 7 µm dicke Gefrierschnitte im Kryostaten (- 20°C) angefertigt. Bei Vorversuchen schwamm ein großer Teil der Schnitte bei den häufigen Spülvorgängen ab. Zur besseren Haftung der Schnitte auf dem Objektträger wurden diese daher gründlich mit Aceton gereinigt; die Adhäsion war zusätzlich unmittelbar nach Aufnahme des Schnittes auf den Objektträger durch kurze Erwärmung auf dem Handrücken zu verbessern. Anschließend wurden die Schnitte für durchschnittlich 1 Std. bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

4. Inkubationsfolge zur immunhistologischen Darstellung der Lymphozytenpopulationen: (vgl. Abb.1)

1. Fixation der Präparate in Aceton für 10 Min.
2. Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung wurden die Schnitte mit je 200 µl Schweine-Normalserum (1 : 20 verdünnt mit Tris-gepufferter physiologischer NaCl-Lösung) bedeckt, anschließend für 5 - 10 Min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert; danach konnte das Serum abfließen.
3. Ohne die Schnitte antrocknen zu lassen, folgte sofort die Beschichtung und anschließende Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit den spezifischen Antiseren (Fig. 1 - 1) (Kaninchen-Immunglobuline) gegen T- bzw. B-Lymphozyten für 30 - 60 Min.. Da von mehreren Autoren zu den Verdünnungsstufen der Antiseren unterschiedliche Angaben gemacht werden, (vgl. Sternberger et al, 1970; Taylor u. Mason, 1974; Hoffmann-Fezer, persönliche Mitteilung, 1978) wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen ausgetestet. Wir erreichten bei unseren Versuchen die besten Resultate bei einer Verdünnung des Antiserums von 1 : 50 mit verdünntem

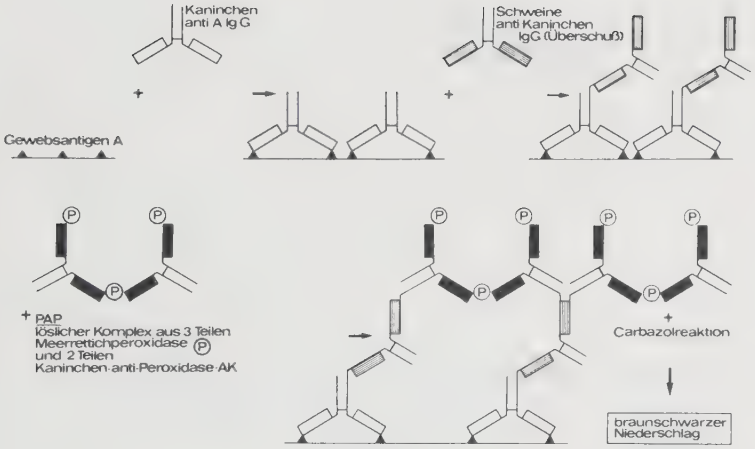


Abb.1 Schematische Darstellung der Peroxidase Antiperoxidase (PAP) Technik

3-AMINO-9-ÄTHYL-CARBAZOL + H_2O_2

Meerrettich-Peroxydase

braunner Niederschlag + H_2O

Oxidative Färbereaktion bei der Carbazolmethode

zu Abb. 1

Schweine-Normalserum (das Schweine-Normalserum war im Verhältnis von 1 : 100 mit Tris-gepufferter physiologischer NaCl-Lösung dabei verdünnt). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden vorsichtig die Schnitte mit Tris-gepufferter physiologischer NaCl-Lösung abgespült.

4. Unmittelbar danach, ohne die Schnitte antrocknen zu lassen, wurde der Schritt 2 wiederholt.
5. Anschließend bedeckten wir die Schnitte mit 1 : 20 verdünntem Schweine-Antiserum gegen Kaninchen-Immunglobuline (mit Tris-gepufferter physiologischer NaCl-Lösung verdünnt) im Überschuß, um eine Bindungsstelle der Schweine-anti-Kaninchen-Immunglobuline für den späteren PAP-Komplex freizuhalten (Fig. 1 - 2), (vgl. Sternberger et al, 1970). Sie wurden mit diesem Serum für 30 - 60 Min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte anschließend ein Spülvorgang wie unter Schritt 3.
6. Unmittelbar danach, ohne die Schnitte antrocknen zu lassen, wurde der Schritt 2 wiederholt.
7. Entsprechend Fig. 1 - 3 wurden die Schnitte mit 1 : 100 verdünntem (wir verdünnten mit 1 : 100 verdünntem Schweine-Normalserum) Peroxydase-anti-Peroxydase-Komplex (PAP-Komplex) bedeckt, wieder für 30 - 60 Min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wie unter Schritt 3 abgespült.
8. Die Schnitte wurden nun 30 Sek. lang bei $4^{o}C$ in 10 %-igem Formalin-Methanol-Gemisch (Verhältnis 9 : 1) fixiert und anschließend gründlich unter fließendem Leitungswasser abgespült.
9. Aufgrund der hohen Toxizität und methodischer Nachteile des Diaminobenzidins (Graham et al, 1964), wie zum Beispiel das schnellere Verblassen des Färbeprodukts sowie die Tendenz zur Ausbildung großer Kristalle, wurde bei der Nachweisreaktion für die Peroxydase 3-Amino-9-

Äthylcarbazol verwandt (vgl. Hoffmann-Fezer, 1974 - 1979). Die Carbazol-Lösung wurde wie folgt vorbereitet:
Es wurden 20 mg Carbazol in 12 ml DMSO (Dimethylsulfoxyd) gelöst, 100 ml Michaelispuffer (Gemisch aus 3 Teilen Veronal-Na und 2 Teilen HCL) hinzugegeben und ad 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 10 µl konz. H_2O_2 zugegeben. In dieser Lösung konnten die Schnitte 30 Min. reagieren und wurden dann mit Leitungswasser abgespült.

10. Die Gegenfärbung der Schnitte wurde mit Hämalaun-Lösung nach Mayer für 10 Min. durchgeführt, und für 10 Min. der Spülvorgang mit Leitungswasser angeschlossen.
11. Die Schnitte wurden mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Bei der Präinkubation der Schnitte mit H_2O_2 (vgl. Taylor, 1974) konnten zwei Karzinome aufgrund einer zu starken Konzentration nicht ausgewertet werden.

5. Semiquantitative Auswertung:

Die mit den verschiedenen Antiseren dargestellten B- und T-Lymphozyten wurden zunächst bei einer Vergrößerung von 250 x semiquantitativ nach dem Vorkommen der verschiedenen Subpopulationen bewertet (+ bis +++). Außerdem wurden Lymphfollikel im Vergleich mit Kontrollpräparaten der Tonsille semiquantitativ erfaßt.

6. Morphometrische Auszählung der B- und T-Lymphozytensubpopulationen:

Bei einer standardisierten 250-fachen Vergrößerung wurden je Fall durchschnittlich vier Schnittpräparate an drei verschiedenen Stellen je fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Dabei wurden die konsekutiven Kryostatschnitte für anti-IgG und -IgM sowie für anti-T getrennt ausgewertet.
Im Meßokular lag ein Meßnetz mit 100 Quadraten von einer Kantenlänge von je 77 µm. Es wurden dabei die in den Quadraten gelegenen positiv angefärbten Lymphozyten pro gesamter Zellfläche angegeben. Die Meßwerte von allen Schnitten wurden addiert und gemittelt. Die Ergebnisse wurden mithilfe des U-Testes geprüft.

III. Ergebnisse

1. Qualitative Befunde

a Tonsillen

Bei der Kontrollfärbung stellten sich nach Anfärbung der B-Lymphozyten die perifollikulären Areale intensiv dar; auch in den Keimzentren waren zahlreiche Lymphozyten mit Kappa- und Lambda-Ketten sowie IgG und IgM nachzuweisen. Die Parakortikalzonen waren hingegen bei der T-Färbung intensiv positiv (Abb. 3, 4). Die B-Lymphozyten zeichneten sich durch eine z.T. intensive Positivität des Zytoplasmas aus, während die T-Lymphozyten lediglich einen sehr schmalen, ringförmig angefärbten Saum im Bereich der Zellmembran zeigten (Abb.2). Die Hintergrundfärbung war in der Regel bei den B-Lymphozyten etwas ausgeprägter als bei den T-Lymphozyten, insgesamt jedoch gering.

b Magenkarzinome

Die Magenkarzinome wiesen ein ähnliches Färbungsmuster für die einzelnen Zelltypen auf, wie es bei der Tonsille beschrieben wurde. Die glatte Muskulatur zeigte eine schwache Anfärbung, die jedoch aufgrund der länglichen Zellform der Muskelzellen klar von den Lymphozyten abgegrenzt werden konnte. Die Unterdrückung der endogenen Peroxydase der Phagozyten nach der Methode von Taylor gelang in der Regel bei der Diaminobenzidin-Methode, während bei Anfärbung mit Carbazol das Färbeergebnis durch die vorherige H_2O_2-Inkubation bisweilen beeinträchtigt war. Die z.T. in Follikeln angeordneten Lymphozyten zeigten eine Schichtung der Follikel mit kappenartiger Anhäufung von positiv dargestellten Lymphozyten, besonders bei der IgM-Inkubation (Abb.5).

2. Semiquantitative Befunde

Die Färbungsergebnisse für die Magenfrühkarzinome und die Magenkarzinome wurden für die Immunglobuline IgG und IgM sowie für das T-Antigen semiquantitativ befundet.

Generell zeigte sich, daß in allen Tumoren T-Lymphozyten häufiger vorkamen als B-Lymphozyten. Beide Arten der Immunozyten waren beim Frühkarzinom wesentlich zahlreicher als bei fortgeschrittenen Karzinomen (Abb.10, 11). Hinsichtlich der B-Lymphozyten-Subpopulation ergab sich die Beobachtung, daß bei Frühkarzinomen IgM-bildende Lymphozyten häufiger vorkamen als IgG-bildende Lymphozyten, und daß bei fortgeschrittenen Karzinomen IgG-bildende Lymphozyten über die IgM-bildenden Lymphozyten dominierten.
Die semiquantitativen Ergebnisse sind im Einzelnen in Tab.2 dargestellt.

3. Quantitative morphometrische Befunde

1.) T-Lymphozyten-Dichte

Die Anzahl der T-Lymphozyten je 6000/μm^2 Standardfläche lag bei den Frühkarzinomen bei 0,48 im Mittel. Bei den fortgeschrittenen Karzinomen wurden dagegen im Mittel nur 0,22 T-Lymphozyten je 6000/μm^2 Standardfläche ermittelt. Die Bereiche sind in Tab.3 aufgelistet.

Bei der statistischen Auswertung ergab sich, daß die T-Lympozytendichte in Frühkarzinomen signifikant über denen der fortgeschrittenen Karzinome liegt mit p 0,01.

2.) B-Lymphozyten-Dichte

Die zunächst versuchte Auswertung der IgG- und IgM-tragenden B-Lymphozyten war nicht möglich, da diese Zellen

Magenfrühkarzinome	anti-T
2908/80	+
1044/80	+++
1043/80	+++
18354/79	+++
13759/78 a	+++
13759/78 b	+++

Semiquantitativ bestimmte Häufigkeit von T-Lymphozyten in Magenfrühkarzinomen

Früh-Ca.	anti-T	anti-IgG	anti-IgM
2908/80	+	++	++
1044/80	+++	+	++
1043/80	+++	++	++
18354/79	++	++	+++
13759/78 a	+++	++	+++
13759/78 b	+++	*	+++

*nicht auswertbar

Semiquantitativ bestimmte Färbeergebnisse für T- und B-Lymphozyten in Frühkarzinomen

Tab. 2

Fortgeschr. Ca	anti-T
25978/79	+
25723/79 a/b	++
8913/79	+++
8562/79	+
6961/79	+
5075/79 a/b/c	++/+/+
4816/79	+
21155/79 a/b	++

Semiquantitativ bestimmte Häufigkeit von
T-Lymphozyten in fortgeschrittenen Magenkarzinomen

Fortgeschr. Ca	anti-T	anti-IgG	anti-IgM
25978/79	+	*	*
25723/79 a	++	*	+
25723/79 b	++	++	+
8913/79	+++	++	+
8562/79	+	+	*
6961/79	+	*	*
5075/79 a	++	+	+
5075/79 b	+	*	+
5075/79 c	+	++	++
4816/79	+	*	+
21155/79 a	++	+	+
21155/79 b	++	+	+

* nicht auswertbar

Semiquantitativ bestimmte Färbeergebnisse für
T- und B-Lymphozyten in fortgeschrittenen Karzinomen

Tab. 2

	$\bar{X}$	Bereich	Laurén-Klass.
1.	11,03	6,20 - 15,80	diffus
2.	57,31	23,53 - 88,80	diffus
3.	58,95	30,53 - 77,93	diffus
4.	66,51	34,20 - 80,60	gemischt
5.	44,73	37,67 - 49,86	gemischt
6.a	51,93	42,40 - 61,47	gemischt
6.b	48,41	42,80 - 55,00	gemischt

Mittelwert 48,41 $\pm$ 17,9
Dichte der T-Lymphozyten/Standardfläche = 0,48/6000 /μm^2

T-Lymphozytendichte bei Frühkarzinomen

	$\bar{X}$	Bereich	Laurén-Klass.
1.	5,96	3,00 - 10,60	nicht klass.
2.	19,29	3,73 - 58,60	gemischt
3.	48,30	25,20 - 71,40	diffus
4.	4,93	3,73 - 6,20	gemischt
5.	6,13	1,13 - 13,40	diffus
6.a	5,58	3,80 - 6,33	gemischt
6.b	7,70	6,20 - 9,00	gemischt
6.c	7,56	3,67 - 11,93	gemischt
7.a	62,90	36,40 - 89,40	nicht klass.
7.b	47,51	10,00 -124,13	nicht klass.

Mittelwert 21,58 $\pm$ 22,4
Dichte der T-Lymphozyten/Standardfläche = 0,22/6000 /μm^2

T-Lymphozytendichte bei fortgeschrittenen Karzinomen

Tab. 3

zum Teil sehr dicht gelagert waren, und daher eine eindeutige Abgrenzung der Zytoplasmasäume aus technischen Gründen zumeist nicht durchführbar war.

Die Auswertung in einzelnen Fällen ergab eine Lymphozytendichte für IgM-tragende B-Lymphozyten (n = 3) zwischen 21,60 und 52,86 und im Mittel 33,33. Die mittlere IgG-Lymphozytendichte war 15,57 pro Gesichtsfeld in 3 Fällen (Schwankungsbreite 0 bis 25,60) eines Frühcarzinoms.

IV. Diskussion

A. Diskussion der Methode

Die Vorteile der verwandten PAP-Methode gegenüber der Immunfluoreszenz-Methode liegen in einer höheren Sensitivität, in ihrer einfachen technischen Handhabung sowie der Gewinnung haltbarer Präparate. Bei der PAP-Methode wurde nämlich im Gegensatz zu Immunfluoreszenz-Methoden eine Abblassung der spezifischen Reaktionsprodukte nicht beschrieben (Nakane et Pierce, 1967).

Das von uns verwandte 3-Amino-9-äthyl-carbazol hat im Vergleich mit Diaminobenzidin nicht nur eine geringere Toxizität und fehlende Kanzerogenität, sondern ließ in unseren Untersuchungen über vier Jahre Farbstabilität des Reaktionsproduktes erkennen. Auf die größere färberische Stabilität des 3-Amino-9-äthyl-carbazols haben auch Graham et Karnovsky, 1964 aufgrund systematischer Untersuchungen hingewiesen. Die angewandte PAP-Methode ist außerdem nach Burns (1975) 20 x empfindlicher als die Peroxydase-markierte Antikörper-Sandwich-Methode, nach Sternberger (1976) 5 x empfindlicher als die nacheinandergeschaltete Anwendung der drei Antikörper mit anschließendem Zufügen der Peroxydase.
Die Spezifität der verwandten Anti-B-Lymphozyten Seren wurde von Taylor (1974) mit dem Ergebnis untersucht, daß sich die Seren der Fa. Dakopatts durch geringste Kreuzaktivität auszeichneten. Bei den eigenen Untersuchungen wurden die gleichen Erfahrungen gemacht. Das Anti-T-Lymphozyten Serum des Instituts Mérieux soll nach den Angaben des Herstellers eine Spezifität von 98 % haben. Eine qualitative Überprüfung der Spezifität der Anti-T Seren wurde durch Einbeziehung von Tonsillen-Kryostatschnitten, meist auf dem gleichen Objektträger versucht.

Positive Färbereaktionen zeigten sich besonders in den Parakortikalzonen unter Aussparung der Follikelkeimzentren der Tonsillen. Dies entspricht der bekannten Verteilung der T-Lymphozyten. Eine Reduktion der Hintergrundfärbung - vorwiegend in den mit Anti-T-Zell Serum behandelten Schnitten - konnten in der vorliegenden Studie durch Vor- und Zwischeninkubation mit Schweine-Normalserum erzielt werden, während Kontrollschnitte ohne eine solche Inkubation eine wesentlich stärkere Hintergrundfärbung zeigten (vgl. auch Taylor, 1975; Burns, 1975). Die Hintergrundfärbung bei den mit Anti-B-Lymphozytenserum behandelten Kryostatschnitten ließ sich jedoch durch die Zwischeninkubation mit Schweine-Normalserum nicht wesentlich beeinflussen. Die relativ starke Hintergrundfärbung und die sehr dichte Lagerung der intensiv angefärbten Lymphozyten bereiteten Schwierigkeiten bei der quantitativen Auswertung der B-Lymphozyten infolge fehlender Differenzierbarkeit der einzelnen Zellgrenzen (vgl. Storch, 1975).

Die endogene Peroxydase der Granulozyten und Makrophagen gab zwar eine unspezifische positive Färbereaktion des Zytoplasmas, die aber aufgrund des granulären Reaktionsmusters, der Form und Größe der Zellen sowie ihrer Kerne von den Lymphozyten gut abzugrenzen war. Eine schwachhomogene unspezifische Positivität der glatten Muskulatur beeinträchtigte die Auswertung der Präparate nicht. Die Blockierung der endogenen Peroxydase durch H_2O_2 in Methanol, die von Taylor (1974) und Burns (1975) bei Untersuchungen von Paraffinschnitten empfohlen wurde, führte bei unseren Kryostatschnitten bei zunehmenden Verdünnungsstufen (zuletzt 0,01 %) gleichzeitig zu einer Unterdrückung der spezifischen Färbereaktion und der Hintergrundfärbung. Es kann vermutet werden, daß die Färbereaktion mit 3-Amino-9-äthyl-carbazol offenbar im unfixierten Gewebe verhindert

wird, oder antigene Eiweißstrukturen durch das Wasserstoffperoxyd zerstört werden.

B. Diskussion der Ergebnisse

Die Bedeutung des lymphatischen Gewebes bei der Abwehr von Tumoren ist seit langem bekannt (Day et Morson, 1978).

Die Abwehrmechanismen können sowohl über das System der B-Lymphozyten mit Bildung tumorspezifischer Antikörper als auch über aktivierte Makrophagen laufen (Löning, T. et al, 1977 u. 1979).
Wahrscheinlich ist die Bildung zytotoxischer T-Lymphozyten und Antikörper-abhängiger Killerzellen von größerer Bedeutung.
Dabei konnte klinisch gezeigt werden, daß Magenkarzinome mit sehr dichter lymphoplasmozellulärer Stromareaktion eine relativ günstige Langzeitprognose aufweisen (Mc Carty, 1922; Fly et al, 1956; Black et al, 1956; Inokuchi et al, 1967; Hawley et al, 1970; Watanabe et al, 1976; Schachenmayer et Haferkamp, 1979).

Unter diesen Umständen lag es nahe, mithilfe der 1976 (Hoffmann-Fezer) erstmals entwickelten Methode zur Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten im Gewebe dieses Problem erneut zu untersuchen. Besonderes Gewicht sollte dabei der Frage zukommen, ob bei limitiertem Tumorwachstum mehr T-Lymphozyten im Tumorgewebe vorkommen als in fortgeschrittenen Tumoren.
Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, daß die Frühkarzinome signifikant mehr T-Lymphozyten enthalten als die fortgeschrittenen Karzinome. Obwohl in einigen Fällen von Frühkarzinomen und fortgeschrittenen Karzinomen ähnlich hohe T-Zell-Konzentrationen gefunden wurden, überraschen die konstant hohen T--Zell-Zahlen dieses Befundes, der auch in ganz unterschiedlichen Anteilen desselben Tumors nachzuweisen ist (vgl. Fall 6).

Bei der quantitativen Auswertung zahlreicher Schnittpräparate kamen fast doppelt soviele T-Lymphozyten wie B-Lymphozyten im Tumorgewebe vor, wobei bisweilen eine manschettenartige Lagerung um kleine Gefäße in unmittelbarer Tumorumgebung auffiel (Abb.8). Von Werkmeister (1979) wurde bereits vermutet, daß es sich bei solchen Aggregaten um T-Lymphozyten handelt.
Auch für einzelne sehr kleine follikelähnliche Ansammlungen von Lymphozyten, die man aufgrund dieser Anordnung zunächst für B-Lymphozyten gehalten hätte, konnte mithilfe der PAP-Methode eine Zusammensetzung aus T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dieser Befund bestätigt Beobachtungen der Gruppe um Werkmeister, die bei Kolonkarzinomen ebenfalls follikelähnliche T-Lymphozyten-Haufen fanden. Bei der semiquantitativen Auswertung der B-Lymphozyten-Subpopulationen fiel auf, daß die IgM-bildenden Lymphozyten über die IgG-bildenden Lymphozyten bei den Frühkarzinomen dominierten. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den fortgeschrittenen Karzinomen das umgekehrte Verhältnis, hier überwogen die IgG-bildenden Lymphozyten.
Es ist nicht anzunehmen, daß für die unterschiedlichen Lymphozytenkonzentrationen ein unterschiedliches Lebensalter verantwortlich ist, da in den vorliegenden Fällen mit Frühkarzinomen ein höheres Lebensalter vorlag. Anhand der kleinen Zahl von untersuchten Karzinomen läßt sich auch nicht sagen, ob diffuse oder intestinale Magenkarzinome (Klass. von Laurén) mit verschiedenen Lymphozyten-Reaktionen einhergehen, Untersuchungen zu den verschiedenen Lymphozytenpopulationen in Magenkarzinomen mit Hilfe der von uns angewandten Methode sind uns aus der Literatur nicht bekannt.
Das Ausmaß der lymphoplasmozellulären Infiltration bei Magenkarzinomen als prognostischer Parameter ist seit

langem Gegenstand von Untersuchungen (vgl. Mc Carty, 1921; Schachenmayer, 1979).
Serologische Untersuchungen zeigen, daß im strömenden Blut bei Magenkarzinomen weniger T-Lymphozyten angetroffen werden als bei gesunden Kontrollpersonen (vgl. Douwes, 1977).

Nach Walters et al (1979) handelt es sich dabei nicht um einen quantitativen Mangel an T-Lymphozyten, sondern um einen qualitativen Defekt, nämlich der Blockierung antigener Strukturen, der die Spontan-Rosettenbildung hemmt (vgl. Weber et al, 1977; Betzler et al, 1978). Gattringer et Wick (1977) konnten jedoch zeigen, daß nach Absättigung dieser E-Rezeptoren sich eine weitere Oberflächen-Antigenstruktur auf den T-Lymphozyten immunfluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe spezifischer Anti-T-Zell-Seren darstellen ließ. Diese Untersuchungsergebnisse stellen die mittels des E-Rosetten-Tests ermittelten T-Lymphozyten-Konzentration in Frage.
Hinsichtlich der Subpopulationen der B-Lymphozyten fanden Löning et al bei ihren Untersuchungen an Dysplasien und Karzinomen der Mundschleimhaut ein Überwiegen der IgG-tragenden Plasmazellen gegenüber den IgM-tragenden Plasmazellen, sowie eine Zunahme des IgG bei steigendem Dysplasiegrad. T-Zellen wurden dabei nicht getrennt untersucht (vgl. Löning et Burkhardt, 1979; Löning et al, 1977; Seifert et Burkhardt, 1977).
Aus Kolon- und Mammakarzinomen wurden Immunzellen isoliert, die zeigen, daß im Frühstadium des Tumors die Konzentration der T-Lymphozyten, aber auch der B-Lymphozyten erhöht ist, und mit zunehmender Tumorprogression abnimmt (vgl. Sion et al, 1972; Zamchek et al, 1972 u. 1975; Patt et al, 1975; Watanabe et al, 1976; Watt et al, 1978; Werkmeister et al, 1979; Pihl et al, 1980; Berg, 1959; Nagel et al, 1977;

Weber et al, 1977). Neben einer unspezifischen Stromareaktion wurden diese Befunde auch als spezifische Antwort des Immunsystems auf das Tumorwachstum hin interpretiert (vgl. Löning et al; Karesen, R., 1974).

Die Rolle der an der Abwehrreaktion beteiligten Immunozyten ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Offen bleibt auch die Frage, ob den Killer-, Null- und T-Lymphozyten ein direkter zytotoxischer Effekt zugeordnet werden kann, oder ob sie eine Helferfunktion zur Unterstützung anderer immunkompetenter Zellen ausüben (vgl. Scheiner et al, 1980; Ross, G.D., 1977; Reinherz und Schloßmann, 1980; De Waele et al, 1981).

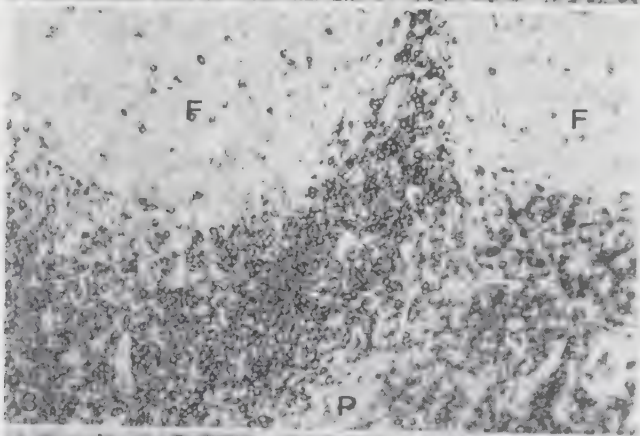
Die Frage, ob mit den uns zur Verfügung stehenden Anti-T-Zell-Seren auch Killer- und Null-Zellen als Untergruppen der T-Lymphozyten erfaßt worden sind, konnte von uns nicht beantwortet werden.
Die vorliegende Untersuchung zeigte, daß die T-Lymphozyten deutlich in der Tumorabwehr bei Frühkarzinomen involviert sind, und daß das Frühkarzinom nicht nur als Tumor mit verminderter Invasionstiefe aufzufassen ist, sondern auch einen Zustand erhöhter Immunabwehr des Organismus darstellt.

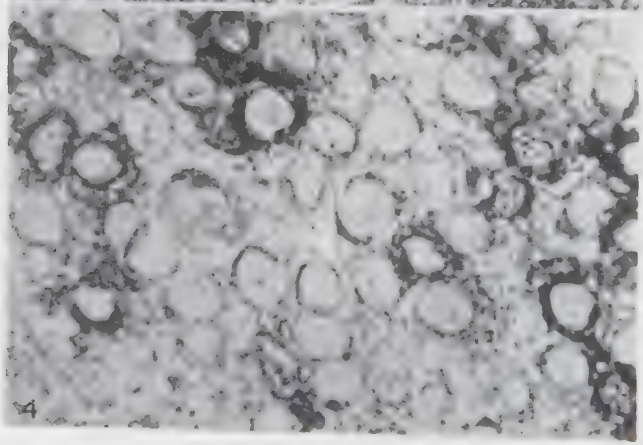
V. Zusammenfassung

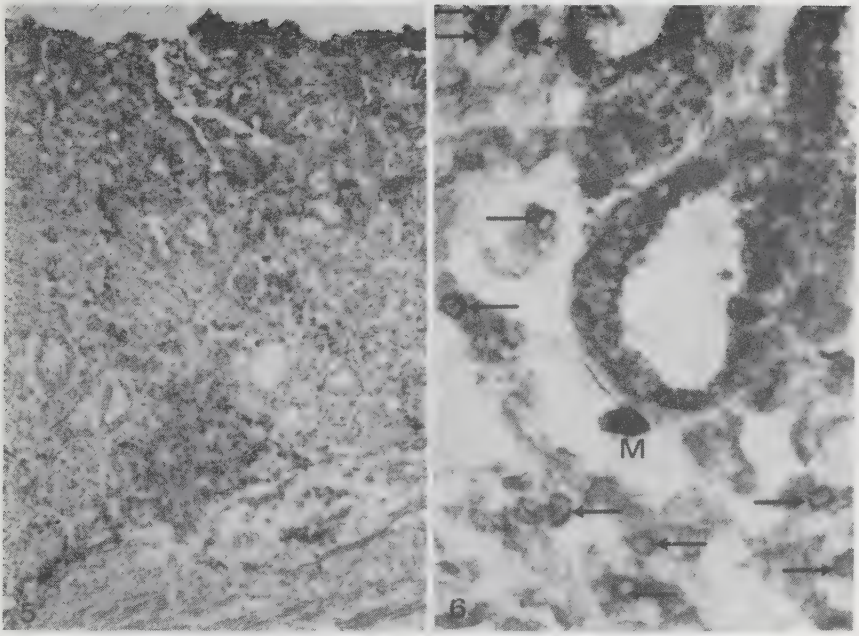
An 6 Frühkarzinomen und 7 fortgeschrittenen Karzinomen des Magens wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung von T- und B-Lymphozyten mit Hilfe der PAP-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend teils semiquantitativ, teils quantitativ ausgewertet.

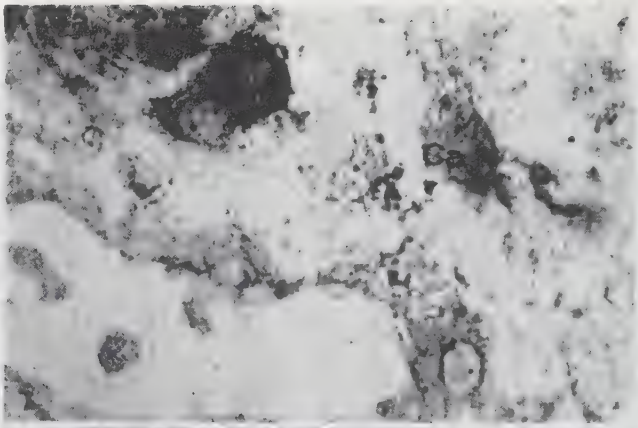
Die durch ein Anti-theta-Serum dargestellten T-Lymphozyten waren in Frühkarzinomen bereits bei semiquantitativer Auswertung deutlich gegenüber den fortgeschrittenen Karzinomen vermehrt. Bei quantitativer Auswertung ergab sich eine mittlere T-Lymphozytendichte von 48,4 / Standardfläche in Frühkarzinomen und von nur 21,6 / Standardfläche in fortgeschrittenen Karzinomen (p 0,01).
Auch die IgM- und IgG-produzierenden Lymphozyten, sporadisch auch die IgA-bildenden Lymphozyten, wurden mit der PAP-Methode dargestellt. Wegen der z.T. dichten Lagerung wurde für diese Immunozyten nur eine semiquantitative Analyse der Dichte im Gewebe durchgeführt. In Frühkarzinomen zeigte sich durchweg auch eine dichtere Lagerung von IgM- und IgG-bildenden Lymphozyten. In je zwei Fällen fand sich bei Frühkarzinom vermehrt IgM, und beim fortgeschrittenen Karzinom IgG. Diese Verschiebung zwischen den einzelnen Subpopulationen der B-Lymphozyten scheint jedoch inkonstant zu sein und ihre Bedeutung ist unklar.
Durch die vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, daß das Magenfrühkarzinom nicht nur durch sein limitiertes Tiefenwachstum charakterisiert ist, sondern auch durch eine ausgeprägtere Immunantwort. Die Bedeutung dieser Befunde wird diskutiert.

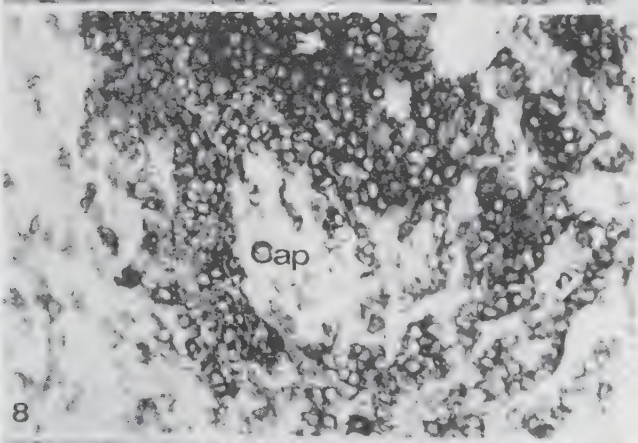
F
F
2

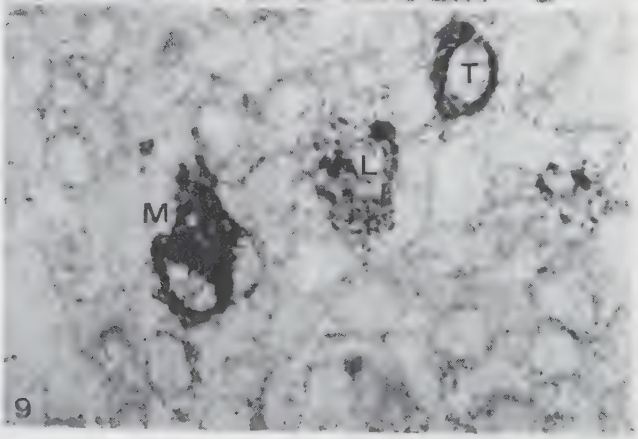

F
F
P

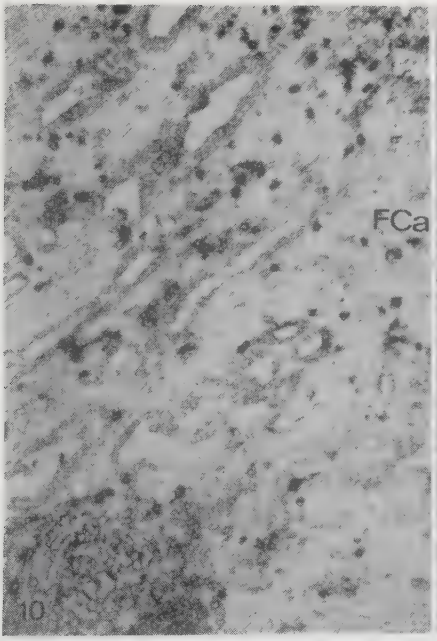

4

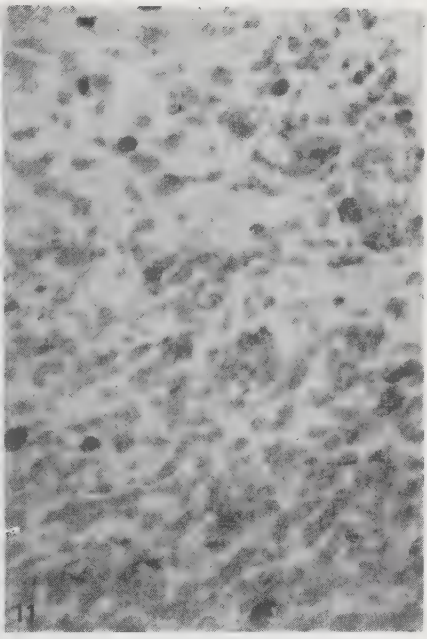

M




Cap
8


T
L
M
9


FCa
10


11

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1 : Schematische Darstellung der PAP-Technik nach Sternberger.

Abb. 2 : Darstellung der B-Lymphozyten (anti-IgM) in einem Kontrollschnitt der menschlichen Tonsille: Kräftige Positivität der perifollikulären Lymphozyten. In den Follikeln (F) spärliches, teils intra-, teils extrazelluläres sekretorisches IgM. Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-IgM; 100 x)

Abb. 3 : Darstellung der T-Lymphozyten in einem Kontrollschnitt der Tonsille:
Kräftige Positivität der Parafollikularzone (P) neben und zwischen den Follikeln (F).
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 100 x)

Abb. 4 : Ausschnitt aus Abb. 3.
Ringförmige Positivität der T-Lymphozyten.
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 1000 x)

Abb. 5 : Darstellung der T-Lymphozyten in einem oberflächlich wachsenden, erosiv veränderten Magen-Frühkarzinom, Positivität zahlreicher isoliert und in einem Lymphhäufchen gelagerten Lymphozyten; unspezifische (?) Mitfärbung der Erosion an der Oberfläche.
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 75 x)

Abb. 6 : T-Lymphozyten (Pfeile) und Makrophage (M) in einem Frühkarzinom des Magens.
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 400 x)

Abb. 7 : Isoliert gelagerter T-Lymphozyt in einem Frühkarzinom neben wenigen diffusen Tumorzellen (Ca).
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 1000 x)

Abb. 8 : Manschettenförmige perikapilläre Lagerung von T-Lymphozyten in einem Frühkarzinom.
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 250 x)

Abb. 9 : T-Lymphozyt (T), polymorphkerniger Leukozyt (L) und Makrophage (M) in einem Randanteil der menschlichen Tonsille.
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 1000 x)

Abb. 10 : Vergleich der T-Lymphozytendichte in dem Rand-
Abb. 11 : anteil eines Frühkarzinoms (FCa, Abb. 10) und in einem fortgeschrittenen Karzinom (Abb. 11). Im Frühkarzinom hohe Dichte diffus angeordneter und angedeutet follikulär gelagerter T-Lymphozyten. Im fortgeschrittenen Karzinom keine T-Lymphozyten mehr; stattdessen nur noch positive Makrophagen.
(Kryostatschnitt, PAP-Technik; anti-Θ; 100 x bzw. 250 x)

Literaturverzeichnis

Barr, R.D.; Allardyce, M.:
Cytochemical identification of human T-lymphocytes.
Can. Med. Assoc. J. 118, 1279 - 1280, 1285 (1978)

Berg, J.W.:
Inflammation and prognosis in breast cancer. A search for host resistance.
Cancer 12, 714 - 720 (1959)

Betzler, M.; Flad, H.D.; Schlag, P.; Herfarth, Ch.:
Einfluß der kurativen Tumorresektion im Gastrointestinaltrakt auf lymphozytäre Subpopulationen.
Zschr. Gastroenterologie, Verhandlungsband I, 53 (1978)

Beutner, E.H.; Sepulveda, M.R.; Barnett, E.V.:
Quantitative studies of immunofluorescent staining. Relationships of characteristics of unabsorbed antihuman IgG conjugates to their specific and non-specific properties in an indirect test for antinuclear factors.
Org. mond. Santé (Wld. Hlth. Org.) 39, 587 - 606 (1968)

Bianco, C.; Patrick, R.; Nussenzweig, V.:
A population of lymphocytes bearing a membrane receptor f r antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization.
J. Exp. Med. 132, 702 - 720 (1970)

Biberfeld, P.; Biberfeld, G.; Molnar, Z.; Fagraeus, A.:
Fixation of cell-bound antibody in the membrane immunofluorescence test.
J. Immunol. Meth. 4, 135 - 148 (1974)

Black, M.M.; Opler, S.R.; Speer, F.D.:
Structural representations of tumor-host relationships in gastric carcinoma.
Surg. Gyn. Obstetr. 102, 599 - 603 (1956)

Bobrove, A.M.; Strober, S.; Herzenberg, L.A.; De Pamphilis, J.D.:
Identification and quantitation of thymus-derived lymphocytes in human peripheral blood.
J. Immunol. 112/2, 520 - 527 (1974)

Bolhuis, R.L.H.; Nooyen, A.J.M.:
Receptors for IgM and IgM-antigen complexes on human T-lymphocytes reacting with specific anti-human-T-cell antiserum.
Immunology 33, 679 - 687 (1977)

Borgers, M.; Verhaegen, M.; de Brabander, M.; Thon'e, F.; van Reempts, J.; Geuens, G.:
Purine nucleoside phosphorylase, a possible histochemical marker for T-lymphocytes.
J. Immunol. Meth. 16, 101 - 110 (1977)

Brutel de la Rivière, A.; Verhoef-Karssen, P.R.; Bosma, A.; Kr.v.d. Borne, A. E.; Engelfriet, P.:
Specific antisera against human blood cells applicable in the indirect immunofluorescence technique.
Scand. J. Immunol. 5, 1065 - 1074 (1976)

Burns, J.:
Background staining and sensitivity of the unlabelled antibodyenzyme (PAP) method. Comparison with the peroxydase labelled antibody sandwich method using formalin-fixed paraffin embedded material.
Histochemistry 43, 291 - 294 (1976)

Castro, J. E.:
Immunological aspects of cancer.
MTP Press 1978

Catovsky, D.; Costello, C.:
Cytochemistry of normal and leucaemic lymphocytes.
Basic Appl. Histochem. 23, 255 - 270 (1980)

Coons, A.H.; Creech, H.J.; Jones, R.N.:
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47, 200 - 202 (1941)

Coons, A.H.; Kaplan, M.H.:
Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J. Exp. Med. 91, 1 - 13 (1950)

Coons, A.H. :
Histochemistry with labeled antibody.
Int. Rev. Cyt. 5, 1 - 23 (1956)

Day, D.W.; Morson, B.C.:
Gastric cancer.
Rec. Adv. Histopath. 10, 159 - 177 (1978)

Dickler, H.B.; Kunkel, H.G.:
Interaction of aggregated y-globuline with B-lymphocytes.
J. Exp. Med. 136, 191 - 196 (1972)

Douwes, F.R.; Hoffmann, W.; Mross, K. Spellmann, H.J.:
Immundiagnostik maligner Erkrankungen. Der Elektrophorese-Motilitäts-Test in der Diagnostik von Malignomen.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 793 - 801 (1977)

Dukor, P.; Bianco, C.; Nussenzweig, V.:
Tissue localization of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes.
Proc. Nation. Acad. Science 67/2, 991 - 997 (1970)

Fly, O.A.; Dockerty, M.B.; Waugh, J.M.:
Metastasis to the regional nodes of the splenic hilus from carcinoma of the stomach.
Surg. Gyn. Obstetr. 102, 279 - 286 (1956)

Gattringer, C.; Wick, G.:
Relationship between E receptors and a T-specific surface antigen on human T-cells.
Immunol. 32, 199 - 205 (1977)

Glöckner, R.; Storch, H.; Wildführ, W.:
Ultrastrukturelle Darstellung oberflächengebundener Immunglobuline an Kulturlymphozyten mit Peroxydase gekoppelten Antikörpern.
Acta histochem. 44, 176 - 179 (1972)

Graham, R.C.; Lundholm, U.; Karnovsky, M.:
Cytochemical demonstration of peroxydase activity with 3-amino-9-ethyl-carbazole.
J.Histochem. Cytochem. 13, 150 - 152 (1965)

Graham, R.C.; Karnovsky, M.:
The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by compled peroxidatic oxidation.
J. Histochem. Cytochem. 13, 604 - 605 (1965)

Graham, R.C.; Karnovsky, M.:
The early stages of absorbtion of injected horseradish peroxydase in the proximal tubules of mouse kidney:
Ultrastructural histochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291 - 302 (1966)

Greaves, M.F.; Bauminger, S.; Janossy, G.:
Lymphocyte activation III. Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations.
Clin. Exp. Immunology 10, 537 - 554 (1972)

Grundmann, E.:
Early gastric cancer.
Springer Verl. 1974

Hawley, P.R.; Westerholm, P.; Morson, B.C.:
Pathology and prognosis of carcinoma of the stomach.
Brit. J. Surg. 57, 677 - 883 (1970)

Hoffmann-Fezer, G.; Rodt, H.; Eulitz, M.; Thierfelder, S.:
Immunhistochemical identification of T- and B-lymphocytes delineated by the unlabeled antibody enzyme method. I. Anatomical distribution of Θ-positive and Ig-positive cells in lymphoid organs of mice.
J. Immunol. Meth. 13, 261 - 270 (1976)

Hoffmann-Fezer, G.; Rodt, H.; Thierfelder, S.:
Immunhistochemical identification of T- and B-lymphocytes delineated by the unlabeled antibody enzyme method. II. Anatomical distribution of T- and B-cells in lymphoid organs of nude mice.
Beitr. Pathol. 161, 17 - 26 (1977)

Hoffmann-Fezer, G.; Thierfelder, S.; Pielsticker, K.; Rodt, H.
Immunhistochemical demonstration of cell surface antigens on tissue sections of lymphomas.
Leuk. Res. 3, 297 - 304 (1979)

Inokuchi, K.; Inutsuka, S.; Furusawa, M.; Soejima, K.; Ikeda,T
Stromal reaction around tumour and metastasis and prognosis after curative gastrectomy for carcinoma of the stomach.
Cancer 20, 1924 - 1929 (1967)

Jondal, M.; Holm, G.; Wigzell, H.:
Surface markers on human T and B lymphocytes I. A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with sheep red blood cells.
J. Exp. Med. 136, 207 - 215 (1972)

Karesen, R.:
The immune reaction against malignant melanoma studied in a biopsy material.
Acta Path. Microbiol. Scand. Section A 82, 116 - 126 (1974)

Keller, R.:
Immunologie und Immunpathologie.
Thieme Verl. 1977

Knowles, D.M.; Holck, S.:
Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alpha-naphthyl-acetat-esterase.
Lab. Invest. 39, 70 - 76 (1978)

Kruse, L.C.; Reese, J.L.; Hart, L.K.:
Cancer, pathophysiology, etiology and management.
The Mosby Company, Fig. 1, S. 220 (1979)

Kunkel, H.G.:
Surface markers of human lymphocytes.
Behring Inst. Mitteilung 59, 1 - 10 (1979)

Lay, W.H.; Mendes, N.F.; Bianco, C.; Nussenzweig, V.:
Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes.
Nature 230, 531 - 532 (1971)

Leduc, E.H.; Scott, G.B.; Avrameas, S.:
Ultrastructural localization of intracellular immune-globulines in plasma cells and lymphoblasts by enzyme-labeled antibodies.
J. Histochem. Cytochem. 17/4, 211 - 224 (1969)

Löning, T.; Burkhardt, A.; Seifert, G.; Gebbers, J.-O.:
Zur Typisierung der Immunglobuline in oralen Leukoplakien und Karzinomen.
Dtsch. Z. Mund-Kiefer-Gesichts-Chir. 1, 168 - 177 (1977)

Löning, T.; Burkhardt, A.:
Plasma cells and immunglobulin-synthesis in oral precancer and cancer.
Virch. Arch. A Path. Anat. Hist. 384, 109 - 120 (1979)

Mac Carty, W.C.; Mahle, A.E.:
Relation of differentiation and lymphocytic infiltration to postoperative longevity in gastric carcinoma.
J. Lab. Clin. Med. 6, 473 - 480 (1921)

Mac Carty, W.C.:
Factors which influence longevity in cancer.
Ann. Surg. 76, 9 - 12 (1922)

Manousos, O.N.; Economidou, J.; Pathouli, C.; Merikas, G.:
Disturbance of cell-mediated immunity in patients with carcinoma of colon and rectum.
Gut 14, 739 - 742 (1973)

Mason, D.Y.; Farrel, C.; Taylor, C.R.:
The detection of intracellular antigens in human leucocytes by Immunoperoxydase staining.
Brit. J. Haematol. 31, 361 - 370 (1975)

Mercier, P.:
The rosettes and the immuno-cyto-adherence: analytic assay.
Biomed. 20, 17 - 23 (1974)

Mesa-Tejada, R.; Pascal, R.; Fenoglio, C.M.:
Immunoperoxydase: A sensitive immunohistochemical technique as a special stain in the diagnostic pathology laboratory.
Human Pathol. 8/3, 313 - 320 (1977)

Moretta, L.; Ferrarini, M.; Durante, M.L.; Mingari, M.C.:
Expression of a receptor for IgM by human T cells in vitro.
Eur. J. Immunol. 5, 565 - 569 (1975)

Mueller, J.; Brun del Re, G.; Buerki, H.; Keller, H.-U.; Hess, M.W.; Cottier, H.:
Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T- and B-lymphocytes in mouse lymph nodes.
Eur. J. Immunol. 5, 270 - 274 (1975)

Nagel, G.A.; Sauer, R.; Herbst, M.; Weber, W.; Halter, K.; Albrecht, R.:
Das Verhalten einzelner Immunparameter bei Patientinnen mit loko-regional begrenztem Mammakarzinom.
Schweiz. med. Wschr. 107, 1007 - 1009 (1977)

Nakane, P.K.; Pierce, G.B.:
Enzyme-labeled antibodies for the light and electron-microscopic localization of tissue antigens.
J. Cell Biol. 33, 307 - 318 (1967)

Nakane, P.K.; Pierce, G.B.:
Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens.
J. Histochem. Cytochem. 14, 929 - 931 (1967)

Nakane, P.K.:
Recent progress in the peroxydase-labeled antibody method.
Ann. New Y. Acad. Scien. 254, 203 - 211 (1975)

Nath, J.; Curtis, J.; Talmar, G.P.:
The use of enzyme markers for the identification of human peripheral B lymphocytes.
Indian J. Med. Res. 64/3, 435 - 439 (1976)

Patt, D.M.; Brynes, R.K.; Vardiman, J.W.; Coppleson, L.W.:
Mesocolic lymph node histology is an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon: an immunomorphologic study.
Cancer 35, 1388 - 1397 (1975)

Pihl, E.; Hughes, E.S.R.; Mc Dermott, F.T.:
Immunopathologie des kolorektalen Karzinoms.
Proktologie 1, 47 - 49 (1980)

Pinkus, G.S.; Hargeaves, H.K.; Mc Leod, J.A.; Nadler, L.M.; Rosenthal, D.S.; Said, J.W.:
Alpha-naphthyl acetat esterase activity: a cytochemical marker for T-lymphocytes. Correlation with immunologic studies of normal tissue, lymphocytic leukemias, non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, and other lymphoproliferative disorders.
Amer. J. Path. 97, 17 - 41 (1979)

Reinherz, E.L.; Schlossmann, S.F.:
Regulation of immune response-inducer and suppressor-T-lymphocyte subsets in human beings.
N. Engl. J. Med. 303, 370 - 373 (1980)

Rodt, H.; Thierfelder, S.; Eulitz, M.:
Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation III. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice.
Eur. J. Immunol. 4, 25 - 29 (1974)

Rodt, H.; Thierfelder, S.; Thiel, E.; Götze, D.; Netzel, B.; Huhn, D.; Eulitz, M.:
Identification and quantitation of human T-cell antigen by antisera purified from antibodies crossreacting with hemopoietic progenitors and other blood cells.
Immunogenetics 2, 411 - 430 (1975)

Roitt, J.:
Immunologie
Steinkopf Verl. 1977

Ross, G.D.:
Surface markers of B and T cells. Recent technical developments reveal a heterogeneity of lymphocyte subpopulations.
Arch. Path. Lab. Med. 101, 337 - 341 (1977)

Seifert, G.; Burkhardt, A.:
Neuere morphologische Gesichtspunkte bei malignen Tumoren der Mundschleimhaut.
Dtsch. Med. Wschr. 102, 1596 - 1601 (1977)

Sell, S.:
Immunologie, Immunpathologie und Immunität.
Verlag Chemie 1977

Seymour, G.J.; Dockrell, H.M.; Greespan, J.S.:
Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease.
Clin. Exp. Immunol. 32, 169 - 178 (1978)

Sim, J.S.; French, S.W.:
Peroxidase-antiperoxydase complex.
Arch. Pathol. Lab. Med. 100, 550 - 553 (1976)

Sion, A.; Fridell, M.T.:
Cellular immunity: polyps and carcinoma of the colon.
Int. Surg. 57, 384 - 394 (1972)

Sullivan, J.L.; Osborne, W.R.A.; Wedgwood, R.J.:
Adenosine deaminase activity in lymphocytes.
Brit. J. Haematol. 37, 157 - 158 (1977)

Schachenmayr, W.; Haferkamp, O.:
Prognostic significance of stromal reaction in gastric carcinoma.
Gastric Cancer, Springer Verl., S. 182 (1979)

Schreiner, O.; Rumpold, H.; Steiner, R.; Kraft, D.:
Killer- und Natural-Killer-Zellen: Charakteristika, Funktion und biologische Bedeutung.
Winer Klin. Wschr. 92, 147 - 156 (1980)

Steiner, P.; Maimon, S.; Palmer, W.; Kirsner, J.:
Gastric cancer: Morphologic factors in five-year survival after gastrectomy.
Amer. J. Path. 24, 947 - 961 (1948)

Sternberger, L.A.:
Elektron microscopic immunocytochemistry: A review.
J. Histochem. Cytochem. 15/3, 139 - 159 (1967)

Sternberger, L.A.; Cuculis, J.:
Method for enzymatic intensification of the immunocytochemical reaction without use of labeled antibodies.
Abstracts Histochem. Soc., 190 (1969)

Sternberger, L.A.; Hardy, P.H.; Cuculis, J.; Meyer, H.G.:
The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxydase-anti horseradish peroxydase) and its use in identification of spirochetes.
J. Histochem. Cytochem. 18/5, 315 - 333 (1970)

Sternberger, L.A.; Petrali, J.P.:
The unlabeled antibody enzyme method immunhistochemistry of hormone receptors at target cells.
1. Int. Symp. Immun. Enzym. Techn. INSERM Symp. 2, 43 - 58 (1976)

Storch, H.:
Mambranmuster bei der Darstellung von Oberflächenimmunglobulin an menschlichen Lymphozyten mit peroxydase-markierten Antikörpern.
Zschr. Inn. Med. 30/24, 789 - 792 (1975)

Taylor, C.R.; Mayson, D.Y.:
The immunohistological detection of intracellular immunglobulin in formalin-paraffin sections from multiple myeloma and related conditions using the immunoperoxydase technique.
Clin. Exp. Immunol. 18, 417 - 429 (1974)

Taylor, C.R.; Burns, J.:
The demonstration of plasmacells and other immunoglobulin containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxydase-labeled antibody.
J. Clin. Path. 27, 14 - 20 (1974)

Taylor, C.R.:
The nature of Reed-Sternberg cells and other malignant reticulum cells.
Lancet 5, 802 - 807 (1974)

Taylor, C.R.:
An immunohistological study of follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease.
Eur. J. Cancer 12, 61 - 75 (1976)

Taylor, C.R.; Anaguostou, D.; Parker, J.; Chir. B.; Tindle, B.; Lukes, R.:
Lacunar cells of nodular sclerosing Hodgkin's disease.
Cancer 39, 1032 - 1043 (1977)

Taylor, C.R.:
Immunohistochemical methods in the study of lymphoma and related conditions.
J. Histochem. Cytochem. 26/7, 496 - 512 (1978)

Underwood, J.C.E.; Carr, J.:
The ultrastructure of lymphoreticular cells in non-lymphoid human neoplasms.
Virch. Arch. B Zellpath. 12, 39 - 50 (1972)

Underwood, J.C.E.:
An ultrastructural analysis of lymphoreticular cell interactions in primary cultures of human non-lymphoid neoplasms and lymphomas.
J. Path. 120, 75 - 82 (1976)

De Waele, M.; Thielemans, C.; Van Camp, B.:
Characterization of immunoregulatory T cells in EBV-induced infectious mononucleosis by monoclonal antibodies.
New Engl. J.Med. 304, 460 - 462 (1981)

Wagener, C.; Csaszar, H.; Totovic, V.; Breuer, H.:
A highly sensitive method for the demonstration of CEA in normal and neoplastic colonic tissues.
Histochem. 58, 1 - 11 (1978)

Walters, B.A.; Rutherford, J.C.; Wall, J.R.:
Incresed active rosette formation in patients with gastrointestinal cancer after enzyme treatment of lymphocytes in vitro.
Austr. NZ. J. Med. 8, 610 - 614 (1978)

Warnatz, H.:
Tumorimmunologie.
Thieme-Verl. (1975)

Warnatz, H.:
Neue Aspekte der Krebsbekämpfung.
Thieme-Verl. (1978)

Watanabe, H.; Enjoj, M.; Imai, T.:
Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations.
Cancer 38, 232 - 243 (1976)

Watt, A.G.; House, A.K.:
Colonic carcinoma. A quantitative assessment of lymphocyte infiltration at the periphery of colonic tumour related to prognosis.
Cancer 41, 279 - 282 (1978)

Weber, W.; Nagel, G.A.; Obrist, R.; Nagel, E.; Heitz, P.; Oberholzer, M.; Herzig, D.:
Differenzierung von Lymphozytenpopulationen im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom.
Schweiz. Med. Wschr. 107, 1010 - 1012 (1977)

Werkmeister, J.A.; Pihl, E.; Nind, A.P.; Flannery, G.R.; Nairn, R.C.:
Immunoreactivity by intrinsic lymphoid cells in colorectal carcinoma.
Brit. J. Cancer 40, 839 - 847 (1979)

Wybran, J.; Carr, M.C.; Fudenberg, H.H.:
The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus-derived cells.
J. Clin. Invest. 51, 2537 - 2543 (1972)

Yoshida, T.O.; Anderson, B.:
Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 401 - 408 (1972)

Zamcheck, N.; Moore, T.L.; Dhar, P.; Kupchik, H.:
Immunologic diagnosis and prognosis of human digestive-tract cancer: Carcinoembryonic antigens.
New Engl. J. Med. 286, 83 - 86 (1972)

Zamcheck, N.; Doos, W.G.; Prudente, R.; Lurie, B.B.; Gottlieb, L.S.:
Prognostic factors in colon carcinoma. Correlation of serum carcinoembryonic antigen level and tumour histo-pathology.
Human Path. 6, 31 - 45 (1975)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Borchard möchten wir für die freundliche Überlassung des Themas und für seine stets wohlwollende Förderung danken.
Frau Dr. Hoffmann-Fezer danken wir für die einführende Unterweisung in die PAP-Technik.

LEBENSLAUF

Am 16.01.1954 wurde ich, Soussan Salehnia, als Tochter des Arztes Dr. Khalil Salehnia und seiner Ehefrau Parvaneh, geb. Asgharzadeh Parsa, in Teheran, Iran geboren.

Im Alter von sechs Jahren zog ich mit meinen Eltern von Teheran, wo ich zwei Jahre die Volksschule besuchte, nach Hamburg um. Nach weiterem dreijährigen Besuch der "Mittelweg"-Volksschule und drei Jahren am Helene-Lange-Gymnasium in Hamburg zogen meine Eltern 1968 nach Düsseldorf um. Hier besuchte ich bis 1972 das Cecilien-Gymnasium, anschließend bis zu meinem Abitur 1974 das Clara-Schumann-Gymnasium.

Im Oktober 1974 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf auf, das ich nach zwölf Semestern im Oktober 1980 mit dem Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung beendete.

Seit dem 1.Januar 1981 arbeite ich als Assistenzärztin für Innere Medizin am DRK-Krankenhaus in Wuppertal.

LEBENSLAUF

Am 01.12.1946 wurde ich, Heinz-Jürgen Bach, als Sohn der Eheleute Heinz Bach und Ruth Bach, geb. Kern, in Solingen geboren.

Von 1953 bis 1958 besuchte ich die Volksschule Heiligenstock in Solingen. Nach dreijährigem Realschulbesuch an der Albert-Schweitzer-Schule in Solingen schloß ich 1964 eine Lehre im Maschinenbau mit dem Facharbeiterbrief ab und arbeitete in diesem Beruf bis zu meiner Einberufung zum achtzehnmonatigen Wehrdienst 1966. Anschließend arbeitete ich im elterlichen Betrieb bis zum Abschluß meiner Handelsschulprüfung und des Kaufmannsgehilfenbrief 1970. Neben einem Studium der Betriebswirtschaft an der Fachhochschule Köln bereitete ich mich von 1970 bis 1972 auf die Begabtenreifeprüfung vor, die ich 1972 am Wissenschaftlichen Prüfungsamt in Bonn bestand.

An den Universitäten Köln und Münster studierte ich Jurisprudenz bis zu meiner Zulassung 1974 zum Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. Nach einem zwölfsemestrigen Studium bestand ich im Oktober 1980 den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Am 6. November 1980 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Seit dem 1. März 1981 arbeite ich als Assistenzarzt für Innere Medizin am DRK-Krankenhaus in Wuppertal.